

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



1000 13 SEP 2000

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen: 199 47 286.6

Anmeldetag: 30. September 1999

Anmelder/Inhaber: Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH,
Braunschweig/DE

Bezeichnung: Estergruppenspaltendes Enzym aus Thermo-
monospora fusca

IPC: C 12 N, C 07 K, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
 Im Auftrag

Joost

Estergruppenspaltendes Enzym aus *Thermomonospora fusca*

Die Erfindung betrifft ein estergruppenspaltendes Enzym (im folgenden auch EGS-Enzym genannt) aus *Thermomonospora fusca*, ein Verfahren zu dessen Herstellung sowie seine Verwendung zum Abbau bzw. zur Behandlung von Estergruppen enthaltenden Polymeren und niedermolekularen Verbindungen.

Einleitung und Stand der Technik

Polymere und makromolekulare Werkstoffe, die einem kontrollierten biologischen Abbau unterliegen können, gewinnen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Eine Reihe von derartigen Produkten sind auf dem Markt bereits im industriellen Maßstab verfügbar. Innerhalb dieser neuartigen Produkte nehmen Estergruppen enthaltende Polymere (z.B. Polyester, Polyesterurethane, Polyesteramide) eine zentrale Rolle ein. Beispiele für bioabbaubare Kunststoffe auf Polyesterbasis sind z.B. Poly(β -hydroxybutyrat-co- β -hydroxyvalerat), Poly(ϵ -caprolacton) oder Poly(butylensuccinat).

Da Polymere aufgrund ihrer Molekülgröße die äußere Membran der mikrobiellen Zellen nicht passieren können, ist der erste und in der Regel geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Abbaus eine Molmassenreduzierung (Depolymerisierung) durch extrazelluläre Enzyme. Polyester sind deshalb potentiell bioabbaubar, da die Esterbindungen grundsätzliche Angriffspunkte für solche extrazellulären hydrolysierenden Enzyme darstellen

Für aliphatische Polyester sind seit langem Untersuchungen zum biologischen Abbau mit Hilfe solcher hydrolysierenden Enzyme (z.B. Lipasen, PHB-Depolymerasen) bekannt [Tokiwa et al., Polym. Mater. Sci. Eng. 62(1990), 988-992] [Jendrossek et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 46(1996), 451-4631]. Das Material wird mit einem entsprechenden Enzym unter geeigneten Bedingungen inkubiert und der Abbau über die Bildung von Spaltprodukten im umgebenden Medium oder über den Gewichtsverlust der Proben bestimmt. Für die natürlichen Polyhydroxyalkanoate wurden in der Regel hierfür speziell isolierte Hydrolysen (PHB-Depolymerasen) eingesetzt, während für den Abbau synthetischer Polyester nicht speziell für den Zweck des Polymerabbaus isolierte kommerzielle Lipasen etc. verwendet wurden.

Während viele aliphatische Polyester sich grundsätzlich als biologisch angreifbar erwiesen haben, gelten aromatische Polyester [z.B. Poly(ethylenterephthalat), Poly(propylenterephthalat), Polybutylenterephthalat)] bekanntermaßen als biologisch resistent. Um die vergleichsweise zu aliphatischen Polyestern besseren Verarbeitungs- und Anwendungseigenschaften der aromatischen Strukturen zu nutzen, sind in den letzten Jahren biologisch abbaubare aliphatische-aromatische Co-

polyester entwickelt worden und werden in industriellem Maßstab hergestellt [Presseinformation der BASF AG, Ludwigshafen, zur K'98-Messe in Düsseldorf vom 17.03.98].

Durch die Einführung der aromatischen Komponenten wird jedoch die biologische Abbaugeschwindigkeit signifikant vermindert [Müller et al., Polym. Degrad. Stab. 59 (1998), S. 203-208]. So kommen z.B. Jun et al. [Jun et al., J. Environ., Polym. Degrad. 2(1) (1994), S. 9-18] zu dem Schluß, daß Copolyester aus PET und PCL nicht signifikant durch Lipasen (z.B. *Pseudomonas-sp.*-Lipase) angegriffen werden.

Ein Abbau von insbesondere Polyesteramiden mit verschiedenen üblichen kommerziellen Lipasen unter technischen Aspekten ist kürzlich beschrieben worden [WO 98/36086]. In diesem Patent wird auch die Auflösung eines Copolyesters aus Butandiol, Terephthalat (40 Mol.-%) und Adipat (60 Mol.-%) beschrieben. Die vermeintlich für technische Anwendungen geeignete Reaktionen werden durch beispielweise 50 mg Enzym (Lipase aus *Candida antarctica*) zu 0,3-1,8 g eines Polyesteramides in Folien- bzw. Plattenform erreicht. Die erzielten Abbauraten liegen im Bereich von 600 mg Abbau/Woche. Für den beschriebenen Abbau des aliphatisch-aromatischen Copolyesters muß eine Enzymmenge von 1% (in 100 ml Puffer) zu einem feinen Pulver des Copolyesters gegeben werden. Trotz der durch die kleine Partikelgröße bedingten erheblich größeren Oberfläche wird hier nur ein Abbau von 230 mg/Woche erreicht.

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß aliphatisch-aromatische Copolyester durch Mikroorganismenstämme aus der Gruppe der Actinomyceten abgebaut werden können [Kleeberg et al., Appl. Environ. Polym. Degrad. 64(5) (1998), 1731-1735].

Trotzdem besteht immer noch ein Bedarf nach einem hochaktiven estergruppenspaltenden Enzym, daß Polymere auf Polyesterbasis abbauen kann.

Überraschenderweise wurde erfindungsgemäß gefunden, daß biologisch abbaubare, Polyestergruppen enthaltende Polymere, insbesondere auch aliphatisch-aromatische Copolyester, mit dem erfindungsgemäßen, im folgenden näher spezifizierten, extrazellulären Enzym aus dem zu den Actinomyceten gehörenden Mikroorganismus *Thermomonospora fusca*, insbesondere des Stammes *Thermomonospora fusca* DSM 43793, alleine oder im Gemisch mit anderen Enzymen mit einer außergewöhnlich hohen Abbaugeschwindigkeit bzw. -rate depolymerisiert und in niedermolekulare Bruchstücke zerlegt werden können.

Die Erfindung betrifft somit ein estergruppenspaltendes Enzym nach Patentanspruch 1, ein synthetisches Peptid oder Protein nach Patentanspruch 6, polyklonale bzw. monoklonale Antikörper nach Patentanspruch 7 bzw. 8, Hybridiomzellen nach Patentanspruch 9, eine estergruppenspaltende Zusammensetzung nach Patentanspruch 11 sowie die Verwendung eines estergruppenspaltenden Enzyms, synthetischen Peptids oder Proteins oder einer estergruppenspaltenden Zusammensetzung nach Patentanspruch 13.

Vorteilhafte Ausführungsformen sind Gegenstand der Unteransprüche.

Konkreter, jedoch ohne Einschränkung, betrifft die Erfindung ein estergruppenspaltendes Enzym, das erhältlich ist, indem der Mikroorganismus *Thermomonospora fusca* in einem geeigneten

M 31.08.00

Nährmedium, gegebenenfalls in Anwesenheit eines Induktors, kultiviert wird.

Vorzugsweise stammt das erfindungsgemäße estergruppenspaltende Enzym aus dem Thermomonospora-fusca-Stamm, der bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter der Zugangsnummer DSM 43793 hinterlegt ist.

Die Kultivierung kann durch im Batch-, Fed-Batch- oder kontinuierlichen Betrieb in synthetischen oder komplexen Medien erfolgen. Die Mikroorganismen können dabei frei vorliegen oder an einem festen Träger immobilisiert sein. Grundsätzlich kommen sowohl natürliche als auch genetisch veränderte Mikroorganismen in Frage.

Geeignete Induktoren für die Ausscheidung des Enzyms sind beispielsweise die Substrate selber, z.B. aliphatische Polyester und/oder Oligoester, aliphatisch-aromatische Copolyester.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße estergruppenspaltende Enzym außerdem aus dem Nährmedium isoliert, indem aus dem Nährmedium ein enzymhaltiger Kulturerstand gewonnen wird, beispielsweise durch Zentrifugation, der gegebenenfalls konzentriert werden kann, beispielsweise durch Ultrafiltration und/oder Ammoniumsulfatfällung, worauf mit üblichen biochemischen Reinigungsmethoden, beispielsweise durch Chromatographie, insbesondere durch Ionenaustausch- und/oder hydrophobe Interaktionschromatographie, das Enzym gereinigt wird.

Mod. 08.00

6

Das erfindungsgemäße estergruppenspaltende Enzym aus *Thermomonospora fusca* DSM 43793 ist durch folgende Parameter gekennzeichnet:

Molmasse: 27400 D (durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt) bzw. 28200 D (aus der Aminosäuresequenz berechnet)

Temperaturoptimum/-bereich: 65°C (30-80°C),

Temperaturstabilität: 70°C/30 min,

pH-Optimum/-bereich: 6-7 (4- >8),

Isoelektrischen Punkt: 6,4.

Die Substratspezifität umfaßt Estergruppen enthaltende Polymere, Triglyceride, Phthalsäureester.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform hat das erfindungsgemäße estergruppenspaltende Enzym aus *Thermomonospora* DSM 43793 die folgende Aminosäuresequenz:

ANPYERGPNP TDALLEASSG PFSVSEENVS RLSASGFGGG TIYYPREN

NTYGAVAISP GYTGTEASIA WLGERIASHG FVVITIDTIT TLDQPDRAE

QLNAALNHMI NRASSTVRSR IDSSRLAVMG HSMGGGTLR LASQRPDLKA

AIPLTPWHLN KNWSSVTVPY LIIGADLDTI APVATHAKPF YNSLPSSISK

AYLELDGATH FAPNIPNKII GKYSVAWLKR FVDNDTRYTQ FLCPGPRDGL

131.08.00

7

FGEVEEYRST CPF

oder

durch eine durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren entstandene mutierte Aminosäuresequenz, die ein isofunktionelles Enzym ergibt.

Die obige Aminosäuresequenz oder Teile davon können selbstverständlich auch synthetisch nach herkömmlichen Verfahren hergestellt werden, beispielsweise mit einem automatischen "Peptide-Synthesizer".

Die Erfindung betrifft ferner polyklonale und monoklonale Antikörper, die spezifisch gegen ein erfindungsgemäßes ester-spaltendes Enzym oder gegen ein entsprechendes synthetisches Peptid oder Protein mit gleicher Funktion und/oder Aminosäuresequenz gerichtet sind, sowie Hybridomzellen, welche die monoklonalen Antikörper bilden. Die Herstellung von poly- oder monoklonalen Antikörpern bzw. die Herstellung der die letzteren bildenden Hybridome ist seit langem bekannt (vgl. beispielsweise: E. Harlow, D. Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; E. Lidell, I. Weeks, "Antikörper-Techniken", Spektrum Akademischer Verlag, 1996), so daß es keiner weiteren Erörterung bedarf.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung estergruppenspaltende Zusammensetzungen, die ein erfindungsgemäßes estergruppen-spaltendes Enzym und/oder ein entsprechendes synthetisches Peptid oder Protein mit gleicher Funktion und/oder Aminosäuresequenz sowie gegebenenfalls zusätzliche Enzyme, Stabilisa-

toren, geeignete oberflächenaktive Substanzen und/oder geeignete organische Lösungsmittel enthält.

Vorzugsweise handelt es sich bei den zusätzlichen Enzymen um Hydrolasen, insbesondere Esterasen, Proteasen, Cutinasen, Lipasen, Phospholipasen und Lysophospholipasen.

Besonders bevorzugt stammen diese Hydrolasen aus unter Pseudomonas sp., Rizomucor miehei, Candida cylindracea, Candida antartica, Aspergillus niger, Chromobacterium viscosum, Comamonas acidovorans, Rhizopus arrhizus und Rhizopus delamar ausgewählten Mikroorganismen. Besonders geeignet sind auch die in WO98/36086 (Bayer AG), auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird, offenbarten Mikroorganismen.

Die Erfindung gibt außerdem die Verwendung eines erfindungsgemäßen estergruppenspaltenden Enzyms oder eines synthetischen Peptids oder Proteins mit gleicher Funktion und/oder Aminosäuresequenz oder einer erfindungsgemäßen estergruppen-spaltenden Zusammensetzung zum Abbau von Estergruppen enthaltenden niedermolekularen und/oder makromolekularen synthetischen oder natürlichen Verbindungen an.

Vorzugsweise handelt es sich bei den Estergruppen enthaltenen makromolekularen Verbindungen um aliphatische, cycloaliphatische, aliphatisch-aromatische, teilaromatische oder aromatische Polyester bzw. Copolyester, Polyesteramide, Polyestercarbonate oder Polyesterurethane, die kettenverlängert, verzweigt oder vernetzt sein können.

Die Estergruppen enthaltenden makromolekularen Verbindungen können beliebige Form haben und beispielsweise Copolymeren,

11310000

Mischungen bzw. Blends, Composites, Lamine oder Verklebungen mit anderen Werkstoffen bilden.

In Verfahren zum Abbau von Estergruppen enthaltenden niedermolekularen und/oder makromolekularen (polymeren) Verbindungen unter Verwendung des erfindungsgemäßen estergruppenspaltenden Enzyms (oder eines anhand der Aminosäuresequenz synthetisch hergestellten Enzyms) oder einer dieses enthaltenden Zusammensetzung können Auflösungsgeschwindigkeiten erreicht werden, die denen von bislang bekannten Systemen deutlich überlegen sind und eine technische Nutzung der enzymatischen Behandlung von Estergruppen enthaltenden Polymeren ermöglichen. Dies gilt insbesondere für aliphatisch-aromatische Copolyester und Polyester-Blends, die eine hohe wirtschaftliche Bedeutung haben.

Die Verwendung des erfindungsgemäßen estergruppenspaltenden Enzyms (oder eines anhand der Aminosäuresequenz synthetisch hergestellten Enzyms) oder einer diese enthaltenden Zusammensetzung zur Behandlung der oben bzw. im folgenden genannten Polymeren in technisch relevanten Formen, beispielsweise Folien, Spritzgußteile, Beschichtungen, Lamine, Schäumen, Partikel, Verklebungen, kann zur Erhöhung der Metabolisierungsgeschwindigkeit durch Mikroorganismen, zur Aufarbeitung von Produkten im Rahmen eines Recyclings (z.B. zum Lösen von Verklebungen oder Entfernen von Beschichtungen) zur Rückgewinnung von Polymerbausteinen aus bioabbaubaren Polymeren oder zur Oberflächenmodifizierung von Produkten aus Polyester dienen.

Die Behandlung der Polymeren mit einer geeigneten Enzymformulierung, beispielsweise in Form eines rohen Kulturüberstandes

A 01.06.00

von *Thermomonospora fusca*, der gegebenenfalls konzentriert werden kann, eines gereinigten Enzyms oder eines synthetischen Enzyms oder einer diese enthaltenden Zusammensetzung, kann beispielsweise in wässriger Lösung oder durch Auftragen der Enzymformulierung auf die Polymermaterialien erfolgen.

Niedermolekulare Esterverbindungen spielen als Additive in verschiedenen Polymeren eine Rolle. Auch solche Verbindungen lassen sich mit dem erfindungsgemäßen Enzym spalten.

Die durch das erfindungsgemäße Enzym (oder durch ein anhand der Aminosäuresequenz synthetisch hergestellten Enzyms) und/oder die diese enthaltende Zusammensetzung abbaubaren estergruppenhaltigen Polymeren umfassen neben den bereits oben genannten beispielsweise folgende:

Estergruppen enthaltende synthetische und natürliche Polymere, insbesondere Lignine, Lignocellulose, Cutin, Suberin, aliphatische Polyester, insbesondere die in WO98/36086 (Bayer AG), auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird, offenbarten, besonders bevorzugt Polycaprolacton, aromatische oder teilaromatische Copolyester, insbesondere die in WO98/36086 (Bayer AG) offenbarten, besonders bevorzugt Terephthalsäure enthaltende, ganz besonders bevorzugt Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure (BTA), besonders bevorzugt mit einem Anteil von 30-70 Mol-% Terephthalsäure, Polyesteramide, insbesondere die in WO98/36086 (Bayer AG) offenbarten, Polymere, die Urethan- und Estergruppen enthalten, d. h. Polyesterurethane, und segmentierte Polyurethane.

Die Polyester können kettenverlängert, verzweigt oder vernetzt sein.

113108-00

Besonders bevorzugte konkrete Polyester sind Poly(propylen-succinat), Poly(butylensuccinat), Poly(butylensuccinat-co-ethylensuccinat), ein Copolymer aus Bernsteinsäure/Adipinsäure/1,2-Ethandiol/1,4-Butandiol, Copolymeren aus 1,4-Butan-diol/Adipinsäure/Terephthalsäure.

Die durch das erfindungsgemäße Enzym (oder durch ein anhand der Aminosäuresequenz synthetisch hergestellten Enzyms) und/oder die diese enthaltende Zusammensetzung abbaubaren estergruppenhaltigen Polymeren können beispielsweise vorliegen als:

Copolymere oder Gemische (Blends) aus zwei oder mehreren der oben genannten Polymeren,

Composites oder Lamine aus zwei oder mehreren der oben genannten Polymeren oder deren Copolymeren oder Blends,

Composites, Lamine oder Verklebungen mit natürlichen oder modifizierten natürlichen polymeren Werkstoffen, insbesondere Stärke und/oder Cellulose (z. B. Papier),

Composites, Lamine oder Verklebungen mit anderen, nicht notwendigerweise bioabbaubaren Werkstoffen (z.B. Glas),

Polymerformulierungen, die übliche Füllmittel, Faserverstärkungen, Hilfsmittel, Stabilisatoren enthalten.

Die erfindungsgemäße Verwendung umfaßt die Behandlung von Polymeren in Form von Partikeln, Suspensionen, Emulsionen, Beschichtungen, Verklebungen, Filmen, Formkörpern, Fasern oder

03106-00

Vliesen, Geweben, Schäumen. Die Materialien können chemisch, thermisch oder mechanisch vorbehandelt oder unbehandelt eingesetzt werden.

Das Enzym wird beispielsweise in gepufferter Lösung oder in ungepufferter Lösung, gegebenenfalls unter Einstellung des pH-Wertes verwendet.

Die Anwendung erfolgt beispielsweise durch Einbringen von Estergruppen enthaltenden Substanzen in geeignete Enzylösungen oder durch Aufbringen einer geeigneten Enzymformulierung auf entsprechende Substanzoberfächen.

Weitere Verwendungsmöglichkeiten des erfindungsgemäßen Enzyms betreffen die Behandlung der oben definierten Materialien zum Zweck der Vorbehandlung im Zuge einer Entsorgung, die Behandlung der Materialien zur Trennung von Produktkomponenten, die Behandlung der Materialien zum Zweck der Rückgewinnung einzelner oder aller Materialbausteine und die Behandlung von Materialien zum Zweck der Änderung von Oberflächeneigenschaften.

Die folgenden Beispiele dienen zur Veranschaulichung der Erfindung und sind nicht als Beschränkung aufzufassen.

1. Kultivierung von *Thermomonospora fusca* DSM 43793.

Ein steriler mit Alukappen verschließbarer Kulturkolben ohne Schikanen wird zwei Zentimeter hoch mit steriles Medium (entsprechend DIN V 54900, Teil 2) gefüllt. In den Kolben werden 3 g/l eines aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäureester und Adipinsäure synthetisierten Copolyesters gegeben und mit 1 Vol.-

11.01.00

% des Inoculums aus einer Vorkultur von *Thermomonospora fusca* beimpft. Die Kultur wird 18 h bei 55°C auf einem Rundschüttler mit 120 Upm inkubiert.

Nach Abbruch der Kultur werden die Feststoffe mit 8000 x g bei 10°C 20 min abzentrifugiert. Der Überstand enthält das esterspaltende Enzym.

2. Abbau eines aliphatisch-aromatischen Copolyesters mit *Thermomonospora fusca* im Kulturüberstand.

Thermomonospora fusca DSM 43793 wird in einem Mineralsalzmedium (siehe Beispiel 1) 24,8 h bei 55°C kultiviert. 2 ml des organismenfreien Kulturüberstandes werden in eine Reagenzglas gegeben. Ein runder Polymerfilm (Durchmesser 0,9 cm) aus einem Copolyester aus Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure (40 Mol.-% Terephthalsäure in der Säurekomponente) wird in den Kulturüberstand gegeben und 24 Stunden bei 55°C inkubiert. Der Gewichtsverlust des Films beträgt danach 2,575 mg/(cm² Oberfläche).

3. Isolierung des erfindungsgemäßen esterspaltenden Enzyms.

Konzentrierung:

Der Kulturüberstand aus Beispiel 1 wird in einer Amicon-Ultrafiltrationskammer (Volumen: 50 ml, Filtrationsfläche: 47 mm²) unter einem Druck von 3 bar und einer Membran mit einem Cut-off von 10 kDa auf 5% des ursprünglichen Volumens konzentriert.

19.3.1.06.00

14

Die weiter Reinigung erfolgt mit Hilfe einer Standard-FPLC-Anlage "LCC-Plus" mit automatischer Äquilibrierung, Injektion und Elution (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Das konzentrierte Protein im Kulturüberstand (2,1 mg) wird in einem ersten Schritt über eine Ionenaustauschersäule gereinigt.

Parameter:

Säule: UNO-S1-Säule (Säulenvolumen 1,3 ml, BioRad, München)

Startpuffer: 20 mM Citratpuffer (pH 4,0)

Elution: (linearer Gradient) 1 M NaCl im Startpuffer

Flußrate: 2 ml/min

Figur 1 zeigt das Elutionsprofil, wobei der schwarze Balken die Fraktionen markiert, die estergruppenspaltende Aktivität aufweisen.

In einem zweiten Schritt werden durch Ionenaustauschchromatographie erhaltene und Aktivität aufweisende Fraktionen durch hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) weiter gereinigt.

116 µg Protein aus durch Ionenaustauschchromatographie erhaltenen Fraktionen werden auf eine Phenylsepharosesäule aufgetragen

Säule: Phenylsepharose-CL4B-Säule (Säulenvolumen: 1,14 ml, Pharmacia, Uppsala, Schweden)

11.01.00

Startpuffer: 0,5 M Ammoniumsulfat in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,1)

Elution: (Stufengradient) 30% Isopropanol in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,1)

Flußrate: 0,3 ml/min.

Figur 2 zeigt das Elutionsprofil, wobei der schwarze Balken die Fraktionen markiert, die estergruppenspaltende Aktivität aufweisen.

Der Kulturüberstand weist eine spezifische Aktivität von 3,3 U/mg auf. Nach der Ionenaustauschchromatographie wird eine spezifische Aktivität von 218 U/mg und nach der HIC eine von 360 U/mg erhalten.

Charakterisierung des erfindungsgemäßen Enzyms.

Figur 3 zeigt die Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen Enzyms und das "Alignement" zum Sequenzvergleich mit der Triacylglycerol-Lipase aus *Streptomyces albus* G und der Triacylglycerol-Acylhydrolase aus *Streptomyces* sp. M11. Das "Multiple Alignment" wurde mit dem Programm "PileUp" erstellt (Wisconsin Package, Version 9.1, Genetics Computer Group, Madison, WI, USA). Voneinander abweichende Aminosäuren an gleichen Positionen sind schattiert dargestellt. Die schwarz umrandete Box markiert eine hochkonservierte Aminosäuresequenz aus dem Bereich des aktiven Zentrums von Lipasen. Die Sequenzen der beiden *Streptomyces*-Stämme stammen aus der SP-TREMBL-Datenbank (Release 7.0, 08/1998): Q56008 (*Streptomyces* sp. M11), Q59798 (*Streptomyces albus* G).

Zur Aminosäuresequenzierung wurde das EGS-Enzym von den nach der Reinigung noch vorhandenen Fremdproteinen isoliert. Dies erfolgte durch Auftrennung der Proteine mittels präparativer SDS-Gelelektrophorese und Übertragung auf eine PVDF-Membran durch Western-Blotting. Nach der Färbung der Proteinbanden wurde die Bande des Enzyms aus der Membran ausgeschnitten und sequenziert.

Zur Bestimmung der Gesamtsequenz wurde das Enzym mit Trypsin und GIuC verdaut. Die Trennung der entstandenen Peptide erfolgte durch HPLC ("reversed phase"). Die N-terminale Sequenz und die Peptidfraktionen aus der Verdauung der BTA-Hydrolase wurden über einen "Edman-Abbau" in einem "Applied Biosystems 473A Sequencer" ("gas-phase-mode") oder in einem "494A Procise HT Sequencer" ("gas-phase"- und "pulsed-liquid-mode") mit Standardprogrammen des Herstellers analysiert.

Durch Sequenzüberlappung und durch Vergleich der Teilsequenzen des EGS-Enzyms mit den Aminosäuresequenzen zweier bekannter Streptomyces-Lipasen wurde die Gesamtsequenz des Enzyms bestimmt.

4. Abbau von Estergruppen enthaltenen Polymeren mit dem erfundungsgemäßen estergruppenspaltenden Enzym.

Unter sterilen Bedingungen wurde in Reagenzgläsern je ein Polymerfilm ($d = 0,9$ cm) mit 1 ml der gereinigten Enzymlösung (25 μ g Enzym in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1) versetzt. Die Reagenzgläser wurden 17 h bei 55°C inkubiert. Der Gewichtsverlust der Polymerfilme diente als Maß für die Enzymaktivität.

M31-08-00

Neben dem aliphatisch-aromatischen Copolyestern BTA40:60 (40 mol% Terephthalsäure in der Säurekomponente) und BTA 60:40 (60 mol% Terephthalsäure in der Säurekomponente) wird ein aliphatischer Polyester SP3:13 (aus 1,3-Propandiol und Brassylsäure synthetisiert) sowie die kommerziellen Estergruppen enthaltenden Polymere Bayer Tir 1874 (Polyesteramid der Firma Bayer AG), Bionolle (aliphatischer Polyester der Firma Showa Highpolymers) sowie der natürliche bakterielle Polyester P(3HB) abgebaut. Gegenüber P(3HB) weist das estergruppenspaltende Enzym keine erkennbare Aktivität auf. Bayer Tir 1874 war zum Zeitpunkt der Probenahme schon vollständig solubilisiert und die angegebene Aktivität stellt einen Minimalwert dar. Die Ergebnisse sind in Figur 4 dargestellt.

5. Vergleich des erfindungsgemäßen esterspaltenden Enzyms mit der Lipase aus Pseudomonas sp.

In 6 ml physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,0) werden jeweils Filme aus BTA40:60 gegeben. Zu der Lösung werden jeweils 50 µg des jeweiligen Enzyms (erfindungsgemäßes esterspaltendes Enzym bzw. Lipase aus Pseudomonas sp. von SIGMA Chemical Co., EC 3.1.1.3) gegeben. Der Ansatz wird bei der jeweiligen optimalen Temperatur der Enzyme inkubiert. Der Fortschritt des Abbaus wird durch Titration der gebildeten freien Säuren mit 0,1 M NaOH verfolgt. Das Ergebnis ist in Figur 5 dargestellt.

Im Vergleich zur Pseudomonas-sp.-Lipase kann mit dem erfindungsgemäßen Enzym eine wesentlich höhere Hydrolysegeschwindigkeit erreicht werden.

6. Spaltung von Triglyceriden mit dem erfindungsgemäßen esterspaltenden Enzym und mit der Lipase von *Pseudomonas* sp.

0,5 ml der jeweiligen Triglyceride werden mit 5 ml einer Emulsionslösung (4,475 g NaCl, 0,103 g KH₂PO₄ in einem Gemisch aus 75 ml destilliertem Wasser und 135 ml Glycerin (99,5%) gelöst, mit 1,5 g Gummi-Arabicum versetzt und mit destilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt) und mit 4,5 ml destilliertem Wasser versetzt.

Die Substratlösung wird direkt vor Beginn des Enzymtestes angesetzt und mit Hilfe eines Ultraturrax' 1 min bei 13500 Upm homogenisiert.

Danach wird die Substratlösung mit der Enzymlösung versetzt (20 µg Enzym pro 6 ml Substratlösung), der pH-Wert auf pH 7,1 eingestellt und die Esterspaltungen durch Titration mit 0,1 M NaOH verfolgt. In Figur 6 sind die Ergebnisse für Triglyceride mit verschiedener Anzahl an C-Atomen in der Fettsäurekomponente dargestellt.

Es kann ein breites Spektrum an Fettsäuren gespalten werden.

7. Spaltung von Phthalsäureestern mit dem erfindungsgemäßen esterspaltenden Enzym und mit der Lipase von *Pseudomonas* sp.

Die Versuchsansätze entsprechen denen von Beispiel 6. Anstelle der Triglyceride werden Phthalsäureester mit unterschiedlichen Alkoholkomponenten eingesetzt. Während die Lipase aus *Pseudomonas* sp. nur den Dimethyl- und Diethylester spalten kann, hydrolysiert das erfindungsgemäße Enzym auch die Ester mit längerkettigen Alkoholen. Die Hydrolysegeschwindigkeiten

M 31.08.01

sind höher als die der *Pseudomonas*-sp.-Lipase. Die Ergebnisse sind in Figur 7 dargestellt.

Temperaturstabilität: 70°C/30 min,

pH-Optimum/-bereich: 6-7 (4- >8),

Isoelektrischen Punkt: 6,4.

5. Estergruppenspaltendes Enzym nach einem der vorherigen Ansprüche, gekennzeichnet durch die folgende Aminosäuresequenz:

ANPYERGPNP TDALLEASSG PFSVSEENVS RLSASGFGGG TIYYPREN
 NTYGAVAISP GYTGTEASIA WLGERIASHG FVVITIDTIT TLDQPDSRAE
 QLNAAALNHMI NRASSTVRSR IDSSRLAVMG HSMGGGTLR LASQRPDLSKA
 AIPPLTPWHLN KNWSSVTVP LIIGADLDTI APVATHAKPF YNSLPSSISK
 AYLELDGATH FAPNIPNKII GKYSVAWLKR FVDNDTRYTQ FLCPGPRDGL
 FGEVEEYRST CPF

oder

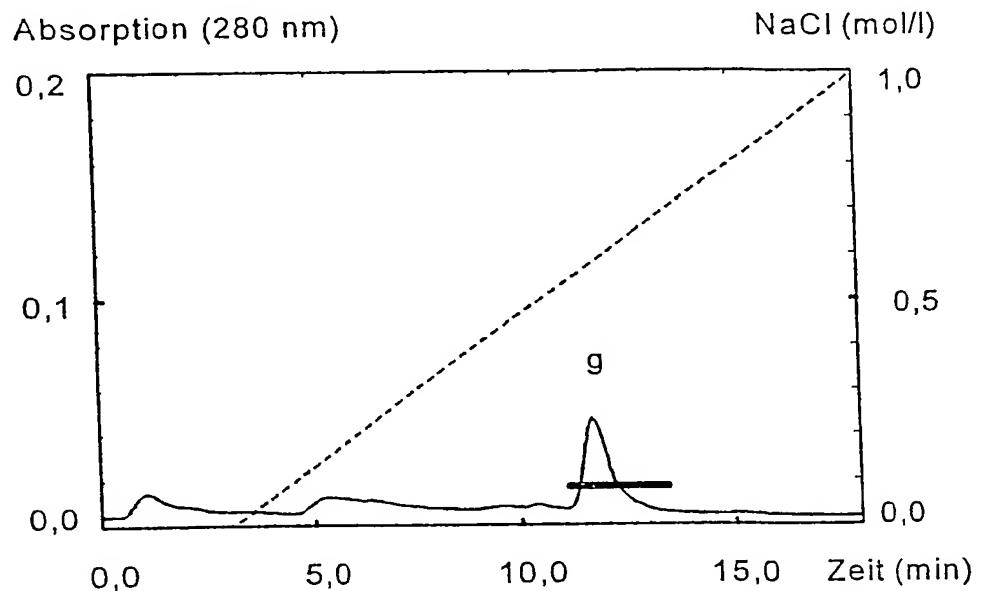
durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren entstandene Mutanten, die isofunktionelle Enzyme ergeben.

6. Synthetisches Peptid oder Protein mit der Aminosäuresequenz des estergruppenspaltenden Enzyms nach Anspruch 5 oder eines Teils dieser Sequenz davon.

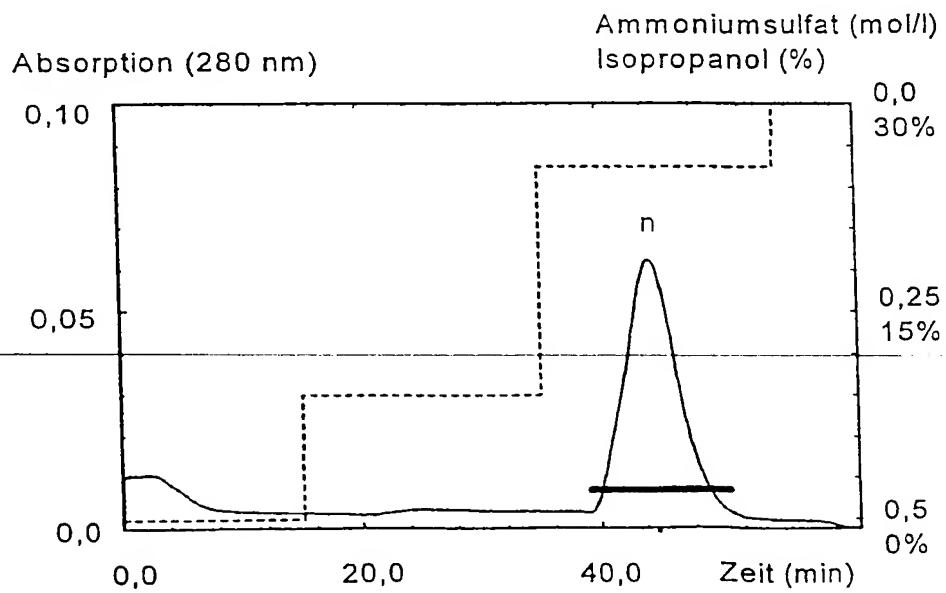
9121-08-00

1

Figur 1



Figur 2



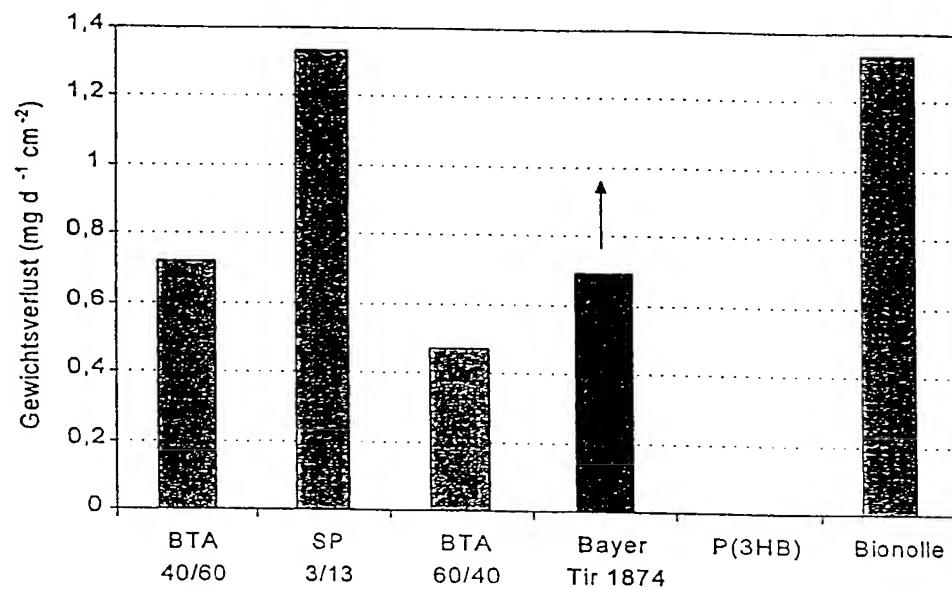
Figur 3

Triacylglycerol Lipase	D N P Y E R G P A P T R A S I E A F R G P Y A V S Q T S V S	10	20	30
Triacylglycerol	A N P Y E R G P A P T N A S I E A S R G P Y A V S Q T S V S			
EGS-Enzym	A N P Y E R G P N P T D A C L E A S S G P E S V S E N V S			
Triacylglycerol Lipase	S L V V S G F G G G T I Y Y P T S T G D G T F G A V V M T P	40	50	60
Triacylglycerol	S L V A S G F G G G T I Y Y P T S T A D G T F G A V V I S P			
EGS-Enzym	R L S A S G F G G G T I Y Y P R E N N N T Y G A V A I S P			
Triacylglycerol Lipase	G F T A T E S S M A W L G P R L A S Q G F V V F T I D T E T	70	80	90
Triacylglycerol	G F T A X Q S S I A W L G P R L A S Q G F V V F T I D T N T			
EGS-Enzym	G Y T G T E A S I A W L G E R A S H G F V V I T I D T E T			
Triacylglycerol Lipase	T L D Q P D S R G R Q M L A A L D Y L T E R - - S S A R T R	100	110	120
Triacylglycerol	T L D Q P D S R G R Q L L S A L D Y L T Q R - - S S V R T R			
EGS-Enzym	T L D Q P D S R A E Q L N A A L N E M I N R A S S T V R S R			
Triacylglycerol Lipase	I D G T R L G V E G H S M G G G G T L E A A K S R P S L K A	130	140	150
Triacylglycerol	V D A T R L G V M G H S M G G G G S L E A A K S R T S L K A			
EGS-Enzym	I D S S R L A V M G H S M G G G G T L R E A S Q R P D L K A			
Triacylglycerol Lipase	A I P L T P W N L D K T W P E V T T P T L V V G A D G D T V	160	170	180
Triacylglycerol	A I P L T G W N T D K T W P E R T P T L V V G A D G D T V			
EGS-Enzym	A I P L T P W H L N K N W S S V T V P T L I N G A D E D T			
Triacylglycerol Lipase	A P V A T H A K P F Y S S L P S S T D R A Y L E L N N A T H	190	200	210
Triacylglycerol	A P V A T H S K P F Y E S L P G S I D K A Y L E L R G A S H			
EGS-Enzym	A P V A T H A K P F Y N S L P S S I S K A Y L E L D G A T H			
Triacylglycerol Lipase	F A P N E S N T T I A K Y S V S W L K R F I D D D T R Y E Q	220	230	240
Triacylglycerol	F A P N E S D P T T I A K Y S I S W L K R F I D S D T R Y E Q			
EGS-Enzym	F A P N E P N K I G K Y S V A W L K R F V D N D T R Y E Q			
Triacylglycerol Lipase	F L C P I P V P D R - - D I E E Y R G T C P I G G	250	260	
Triacylglycerol	F L C P P P R P S L - - T I A E Y R G T C P H T S			
EGS-Enzym	F L C P G P R D G L F G E V E E Y R S T C P H			

2010-08-06

3

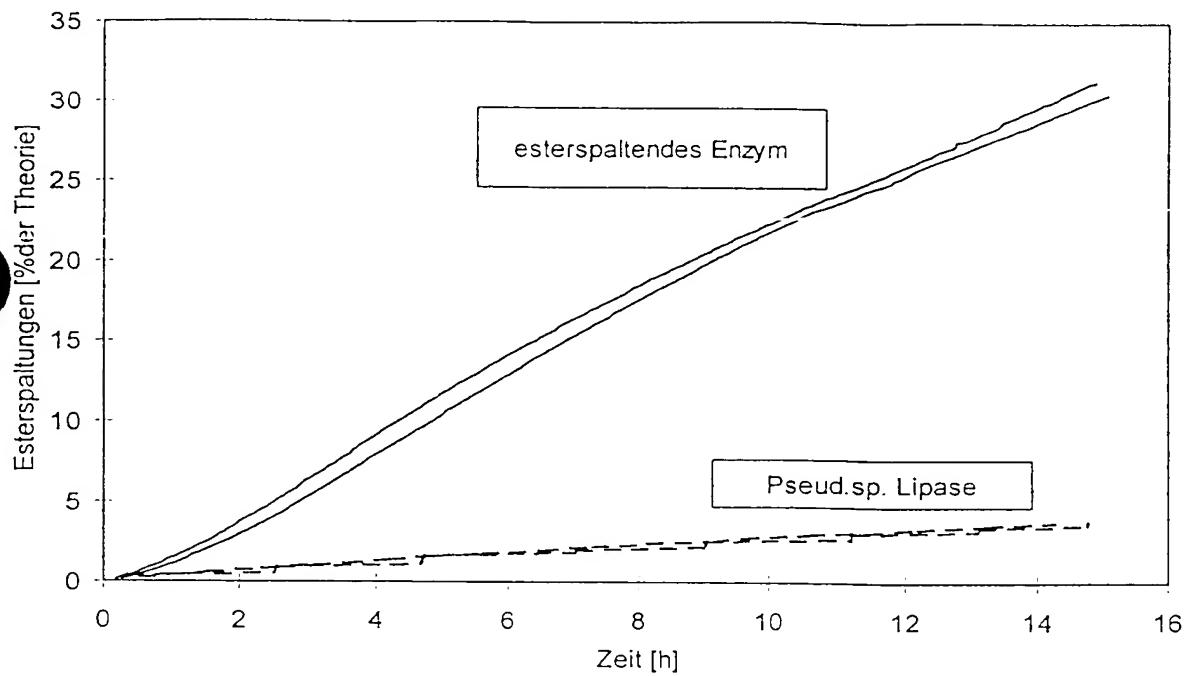
Figure 4



19.1.08.00

4

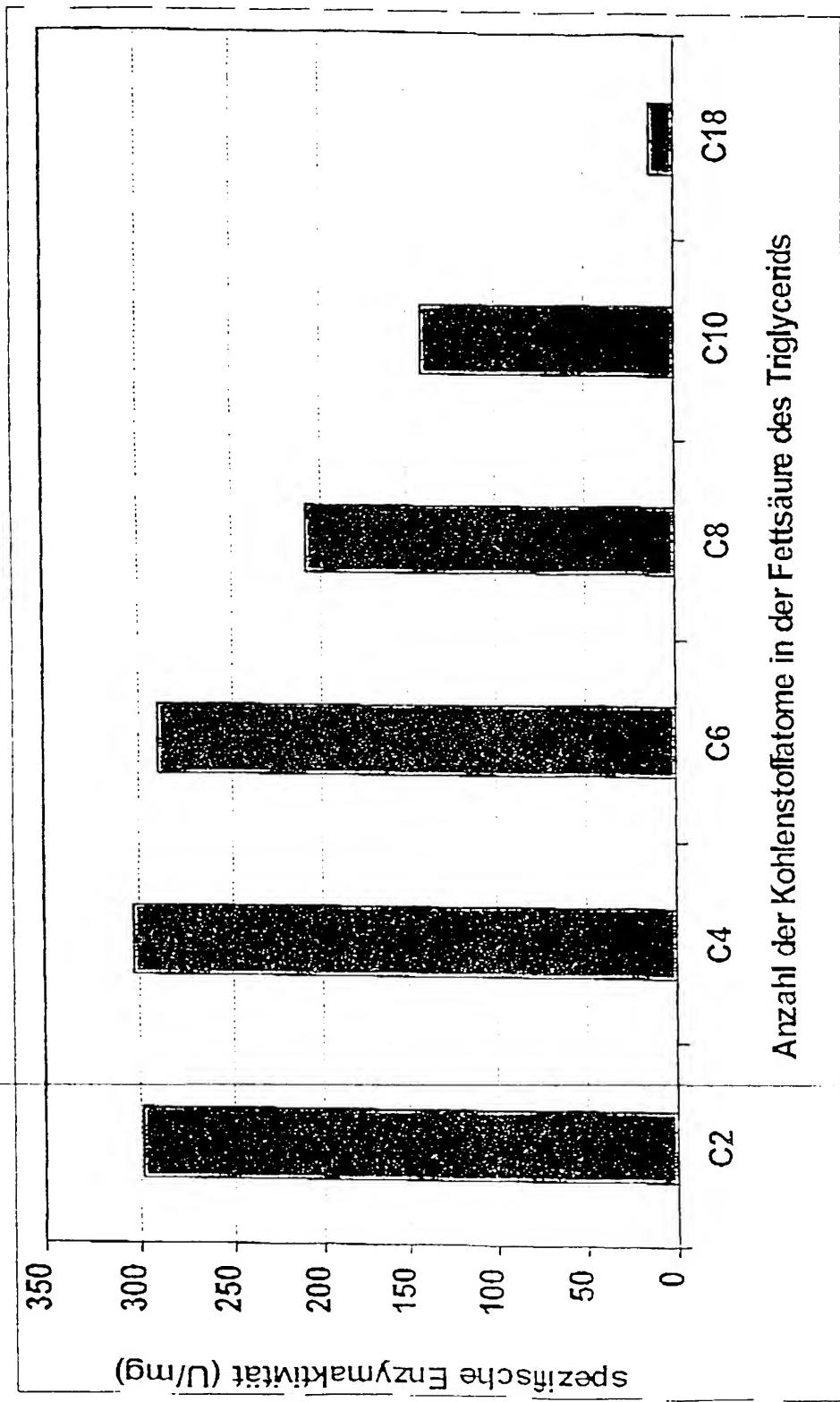
Figur 5



19.08.00

5

Figur 6



1931-08-00

6

Figur 7

